



日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

Docket No: 1422-0561P
Appl No: 10/092,210
Filed: March 6, 2002
Inventor: Twaq KATSUYAMA
BIRCH, STEWART, KOLASCH
& BIRCH, LLP
703) 205-8000

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出願年月日
Date of Application: 2002年 2月26日

出願番号
Application Number: 特願2002-050116

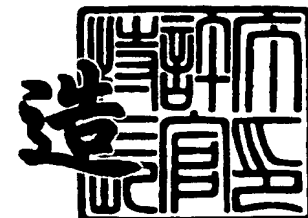
[ST.10/C]: [JP2002-050116]

出願人
Applicant(s): 株式会社生物技術研究所

2002年 4月 5日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2002-3025014

【書類名】 特許願

【整理番号】 P1151

【提出日】 平成14年 2月26日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 A61K 9/00

【発明者】

 【住所又は居所】 大阪府富田林市若松町東1丁目9番32号 株式会社生物技術研究所内

 【氏名】 勝山 巖

【特許出願人】

 【識別番号】 301009597

 【氏名又は名称】 株式会社生物技術研究所

【代理人】

 【識別番号】 100082072

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 清原 義博

【先の出願に基づく優先権主張】

 【出願番号】 特願2001-130414

 【出願日】 平成13年 4月26日

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 036892

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 要約書 1

 【物件名】 図面 1

 【包括委任状番号】 0102198

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 眼精疲労モデル、その作製方法、そのモデルを用いた評価方法
およびその評価法を用いて選択された薬剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 複数回の刺激による収縮反応によって毛様体筋の筋収縮力を実質的に安定的に低下させてなる眼精疲労モデル。

【請求項 2】 当該眼精疲労が調節性眼精疲労である請求項 1 に記載の眼精疲労モデル。

【請求項 3】 非ヒト哺乳動物または家禽から摘出した毛様体筋標本を用いてなる請求項 1 又は 2 に記載の眼精疲労モデル。

【請求項 4】 非ヒト哺乳動物から摘出した毛様体筋標本を用いてなる請求項 1 又は 2 に記載の眼精疲労モデル。

【請求項 5】 平滑筋収縮誘導手段を用いて毛様体筋を複数回収縮させてなる請求項 1 乃至 4 のいずれかに記載の眼精疲労モデル。

【請求項 6】 当該平滑筋収縮誘導手段として、化学物質による化学刺激を用いてなる請求項 1 乃至 5 のいずれかに記載の眼精疲労モデル。

【請求項 7】 当該化学物質としてアセチルコリン、セロトニン、ヒスタミン、ムスカリン、エンドセリンから選ばれる物質を用いてなる請求項 6 に記載の眼精疲労モデル。

【請求項 8】 当該平滑筋収縮誘導手段として電気刺激を用いてなる請求項 1 乃至 5 のいずれかに記載の眼精疲労モデル。

【請求項 9】 当該刺激による収縮反応を少なくとも 3 回繰り返すことにより筋収縮力を実質的に安定的に低下させてなる請求項 1 乃至 8 のいずれかに記載の眼精疲労モデル。

【請求項 10】 当該毛様体筋が $50 \pm 30\%$ の筋収縮力低下率を示してなる請求項 1 乃至 9 のいずれかに記載の眼精疲労モデル。

【請求項 11】 当該毛様体筋が $50 \pm 20\%$ の筋収縮力低下率を示してなる請求項 1 乃至 9 のいずれかに記載の眼精疲労モデル。

【請求項 12】 当該毛様体筋が $50 \pm 10\%$ の筋収縮力低下率を示してなる請求

項 1 乃至 9 のいずれかに記載の眼精疲労モデル。

【請求項 1 3】 複数回の刺激による収縮反応によって毛様体筋の筋収縮力を実質的に安定的に低下させる眼精疲労モデルの作製方法。

【請求項 1 4】 請求項 1 乃至 1 2 のいずれかに記載のモデルに薬剤を接触させ、毛様体筋の収縮率を測定して薬剤の眼精疲労改善効果を評価することを特徴とする眼精疲労改善薬の評価方法。

【請求項 1 5】 薬剤投与前後の毛様体筋の収縮率を測定、比較することによって評価を行うことを特徴とする請求項 1 4 に記載の評価方法。

【請求項 1 6】 マグナス装置を用いて実施することを特徴とする請求項 1 4 又は 1 5 に記載の評価方法。

【請求項 1 7】 請求項 1 4 乃至 1 6 のいずれかに記載の方法を用いて選択される薬剤。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は眼精疲労モデル、その作製方法、そのモデルを用いた評価方法、その評価法を用いて選択された薬剤に関し、より詳しくは調節性眼精疲労における微動調節の改善を治療目的とした薬剤の評価に用いるモデル、その作製方法、そのモデルを用いた評価方法およびその評価法を用いて選択された薬剤に関する。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

眼精疲労は、VDT (Visual Display Terminal) 作業を長時間行った場合や長距離運転で焦点を頻繁に変化させた場合等に生じる。

この眼精疲労は、毛様体筋が過緊張により疲労すると調節が円滑にいかなくなることにより生じるといわれている（日本眼科学会雑誌、92, 1854-1858(1988)）。ここでいう毛様体筋とは、眼組織において水晶体を取り囲み、輪状をなして存在する毛様体筋の主要構成部をなす平滑筋である。

毛様体筋の場合は、それに対する刺激による収縮は単収縮であり、収縮様式は筋の両端を一定の長さに固定して収縮させる等尺性であることが知られている。

そして、筋に対して繰り返し刺激を続けると、筋の収縮張力は次第に減少し、同時に収縮過程の遅延が生じる。この現象を筋の疲労といい、毛様体筋疲労により眼精疲労が生じる。

眼精疲労に対しては点眼剤等の薬剤がその治療に用いられる。

しかしながら、眼精疲労を確実に治療できる薬剤は現在のところ存在しない。また、その薬剤の評価方法についても未だ確立されていない。

【0003】

現在の薬物の評価方法としては様々あるが、臨床試験に先行して行われる試験には大別して*in vivo*系と*in vitro*系がある。特に、評価の初期段階では簡便・迅速であるという理由から*in vitro*系が汎用される。

*In vitro*系での測定の場合、毛様体筋の疲労は筋の収縮力の減少と収縮・弛緩過程の遅延という現象として現れることから、これを直接的に観察することにより測定することができる。

【0004】

具体的には、摘出毛様体筋を対象とするマグヌス法の使用がある。

マグヌス法には、通常、人口栄養液を収納して臓器をこの人工栄養液に浸すための直径約1～2 mm・深さ約2～5 cm程の細管たるマグヌス管、人口栄養液に空気を導入するための空気導入管、臓器の一端部を固定するためのアンカー部分、臓器の他端部を固定してその臓器の張力を測定する張力トランスデューサーおよびマグヌス管を所定の温度（ほとんどの場合37℃）に保温するための恒温槽を主要構成部品とするマグヌス装置が用いられる。

マグヌス法は、生体をそのままの状態の実験に供する場合のように、その生体の他の部分の影響を受けるという問題がなく、さらに摘出された臓器は中枢からの神経支配が除去されていても筋肉内神経叢が残存しているので運動機能は失われないことから生理条件下における測定が可能という利点がある。

マグヌス法による薬理作用を検討したものとしては、ウシの毛様体筋におけるM₃タイプのムスカリン受容体について検討した例（Hiroshi Masuda et al., Gen. Pharmac., 30(4), 579-584(1998)）、およびウシの毛様体筋におけるNOによる筋の弛緩反応について検討した例（Soichiro Kamikawa et al., Exp. Eye Res

., 66, 1-7(1998))、(Hiroshi Masuda et al., Current Eye Research, 16,(12), 1245-1251(1997)) などが報告されている。

さらに、特開平 7-133225においては、塩化カリウムまたはカルバコールにより一過性に筋を収縮させた毛様体筋標本を用いて毛様体筋緊張緩和剤を評価した例が開示されている。

【 0 0 0 5 】

しかし、上記により得られた毛様体筋標本は、収縮惹起物質によって収縮した状態にある毛様体筋であり、本来の疲労状態の毛様体筋とはいえない難かった。

そこで、生体中における疲労が再現できていない標本に対する薬剤の評価では正しい評価がなされたとはいえない。

さらに、上記の開示においては、収縮惹起物質に対する拮抗剤の評価しかできないことから、他の眼精疲労改善用薬剤とその効果を相対的に評価することができなかった。

【 0 0 0 6 】

【発明が解決しようとする課題】

そこで、かかる事情に鑑み、本発明者らは鋭意研究を行った結果、*in vitro*系において生体中に発生する疲労状態の毛様体筋を再現した標本およびその作製方法を見出した。また、眼精疲労改善用薬剤の薬理効果を直接かつ客観的に正しく評価する方法および他の薬剤と相対的に比較する方法を見出し、本発明を完成するに至った。

【 0 0 0 7 】

【課題を解決するための手段】

請求項 1 に係る発明は、複数回の刺激による収縮反応によって毛様体筋の筋収縮力を実質的に安定的に低下させてなる眼精疲労モデルに関する。

請求項 2 に係る発明は、当該眼精疲労が調節性眼精疲労である請求項 1 に記載の眼精疲労モデルに関する。

請求項 3 に係る発明は、非ヒト哺乳動物または家禽から摘出した毛様体筋標本を用いてなる請求項 1 又は 2 に記載の眼精疲労モデルに関する。

請求項 4 に係る発明は、非ヒト哺乳動物から摘出した毛様体筋標本を用いてな

る請求項 1 又は 2 に記載の眼精疲労モデルに関する。

請求項 5 に係る発明は、平滑筋収縮誘導手段を用いて毛様体筋を複数回収縮させてなる請求項 1 乃至 4 のいずれかに記載の眼精疲労モデルに関する。

請求項 6 に係る発明は、当該平滑筋収縮誘導手段として、化学物質による化学刺激を用いてなる請求項 1 乃至 5 のいずれかに記載の眼精疲労モデルに関する。

請求項 7 に係る発明は、当該化学物質としてアセチルコリン、セロトニン、ヒスタミン、ムスカリン、エンドセリンから選ばれる物質を用いてなる請求項 6 に記載の眼精疲労モデルに関する。

請求項 8 に係る発明は、当該平滑筋収縮誘導手段として電気刺激を用いてなる請求項 1 乃至 5 のいずれかに記載の眼精疲労モデルに関する。

請求項 9 に係る発明は、当該刺激による収縮反応を少なくとも 3 回繰り返すことにより筋収縮力を実質的に安定的に低下させてなる請求項 1 乃至 8 のいずれかに記載の眼精疲労モデルに関する。

請求項 1 0 に係る発明は、当該毛様体筋が $50 \pm 30\%$ の筋収縮力低下率を示してなる請求項 1 乃至 9 のいずれかに記載の眼精疲労モデルに関する。

【 0 0 0 8 】

請求項 1 1 に係る発明は、当該毛様体筋が $50 \pm 20\%$ の筋収縮力低下率を示してなる請求項 1 乃至 9 のいずれかに記載の眼精疲労モデルに関する。

請求項 1 2 に係る発明は、当該毛様体筋が $50 \pm 10\%$ の筋収縮力低下率を示してなる請求項 1 乃至 9 のいずれかに記載の眼精疲労モデルに関する。

請求項 1 3 に係る発明は、複数回の刺激による収縮反応によって毛様体筋の筋収縮力を実質的に安定的に低下させる眼精疲労モデルの作製方法に関する。

請求項 1 4 に係る発明は、請求項 1 乃至 1 2 のいずれかに記載のモデルに薬剤を接触させ、毛様体筋の収縮率を測定して薬剤の眼精疲労改善効果を評価することを特徴とする眼精疲労改善薬の評価方法に関する。

請求項 1 5 に係る発明は、薬剤投与前後の毛様体筋の収縮率を測定、比較することによって評価を行うことを特徴とする請求項 1 4 に記載の評価方法に関する。

請求項 1 6 に係る発明は、マグヌス装置を用いて実施することを特徴とする請

求項 1 4 又は 1 5 に記載の評価方法に関する。

請求項 1 7 に係る発明は、請求項 1 4 乃至 1 6 のいずれかに記載の方法を用いて選択される薬剤に関する。

【0 0 0 9】

【発明の実施の形態】

本発明における評価対象の眼精疲労改善用薬剤は、通常、医薬品や医薬部外品であるが、特定保健用食品（機能性食品）、健康食品などの補助食品や食品なども含まれる。

以下に、標本の作製および評価方法について説明する。

第一に、標本である被試験体を準備する。

被試験体である毛様体筋の取得方法は特に限定されないが、例えば以下の方法が挙げられる。

全身麻酔下の試験動物から眼球を摘出し、摘出した眼球を強膜切開し、眼球の赤道面で半分に切断し、水晶体を除去後強膜から毛様体筋を注意深く剥離して毛様体筋を得る。

毛様体筋を得る試験動物としては、非ヒト哺乳動物または家禽類が用いられ、ウシ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、サル、イヌ、ネコ、ウサギ、モルモット、ラット、マウス、ニワトリ、アヒル、ウズラ、ダチョウなどが例示できる。その中でも非ヒト哺乳動物をのうちの一種が好ましく用いられる。

毛様体筋の摘出前の試験動物は、常法に従い同一の条件下で飼育を行うことが好ましい。これは可及的に同一状態の標本を得るためである。

毛様体筋を摘出した後、得られた毛様体筋を所望の大きさに切り、標本を作製する。その大きさは特に制限されないが、例えば、後述のマグヌス管内で反応させるならば、幅 3 mm、長さ 6 mm の条片が好ましい。

【0 0 1 0】

第二に、摘出した毛様体筋に対して複数回の刺激を与えて毛様体筋に収縮反応を生じさせる。用いる刺激は、毛様体筋に収縮反応を惹起するものであれば特に限定されないが、毛様体筋は平滑筋の一種であるため、平滑筋収縮誘導手段を用いることが好ましい。本発明でいう平滑筋収縮誘導手段とは平滑筋に可逆的な収

縮を惹起する刺激を意味する。例として物理刺激、化学刺激、電気刺激をあげることができるが、その中でも生体内での毛様体筋の収縮弛緩を制御している化学刺激あるいは電気刺激を用いることが好ましい。

【0011】

化学刺激に用いることができる物質の例として、アセチルコリン、セロトニン、ヒスタミン、ムスカリン、ニコチン、エンドセリンをあげることができる。その中でも、アセチルコリンを用いることが好ましい。

アセチルコリンは副交感神経から遊離され、コリン作動性受容体を刺激して平滑筋に強い収縮を起こすことが知られている。

セロトニンは有力な脳内化学伝達物質の候補であり、腸粘膜の腸クロマフィン細胞に存在し、そこから血小板内に入る。特に、肺循環で血管平滑筋または摘出腸管および気管支筋などの平滑筋の収縮反応を示すことが知られている。

ヒスタミンは血液中好塩基球と組織肥満細胞に貯蔵されており、炎症とアレルギー反応の主要な役割を演じている。腸蠕動の亢進、胃酸分泌促進、微細毛細血管の拡張および透過性の亢進を引き起こすが、特に気管支の強い収縮と血管などの平滑筋の収縮作用を示すことが知られている。

ムスカリンはキノコ由来のアルカロイドであり、アセチルコチンと同様にコリン作動性受容体を刺激し、その作用はアトロピンで遮断される。すなわち、シナプス後膜に作用し、気管支の強い収縮と血管などの平滑筋の収縮作用を示すことが知られている。

ニコチンはタバコの葉より得られるアルカロイドであり、アセチルコチンと同様にコリン作動性受容体を刺激し、その作用はヘキサメトニウムにより遮断される。即ち、自律神経筋の神経節シナプスならびに運動終板に作用し、気管支の強い収縮と血管などの平滑筋の収縮作用を示すことが知られている。

エンドセリンは21個のアミノ酸からなるポリペプチドであり、ヒトやブタの内皮細胞での産生が確認されている。強力な血管収縮作用および持続的で強い昇圧作用を有することが知られている (Nature, 332, 411-415(1988); FEBS Letters, 231, 440-444(1988))。

【0012】

化学刺激に用いる化学物質の濃度は、用いる化学物質の種類、その目的や状況に応じて適切になるように設定すればよい。その中でも、 $10^{-10} \sim 10^{-1}$ mol/Lであることが好ましく、 $10^{-9} \sim 10^{-2}$ mol/Lであることがさらに好ましい。

【0013】

電気刺激を本発明のモデル作製に用いる際には、電気負荷の方法（直接刺激、間接刺激）、電流の種類（交流、直流など）、電流および電圧の強さ、処理時間、処理回数、各処理間の間隔などの諸条件を適宜設定することで刺激の強さを変化させることができる。用いる条件は標本に惹起させたい疲労の程度などに応じて適宜調整すればよく、特に限定されない。

電気刺激を用いる際には、用いる装置、用いる電極の種類（形状や素材など）、標本のサイズ、標本と電極の位置関係、標本と電極の間に介在する物質の種類（特に間接刺激の場合）など、各種の因子によっても電気刺激の程度が変動するが、本発明の目的にかなった条件設定は、当業者であれば、たとえばMasudaら（Gen. Pharmac., 30, 579-584(1998)）記載の条件を参照することにより適宜行うことができる。

【0014】

収縮反応を生じさせる際に用いる装置は、特に限定されないが、マグヌス装置を用いることが好ましい。なぜなら、摘出された臓器は中枢からの神経支配が除去されていても筋肉内神経叢が残存しているので運動機能が失われないという利点があるからである。

【0015】

マグヌス装置を用いる一実施例を説明する。

まず、マグヌス管内で毛様体筋の条片の一端をマグヌス管の下部にあるアンカー部に掛け、他端部を張力トランスデューサーのフック部に装着し、常法に従って調製した人工栄養液をマグヌス管内に満たし、続いて導入管からマグヌス管内に二酸化炭素5%と酸素95%の混合ガスを通気し、手動で張力トランスデューサーを上下させながら張力を調節して標本に予め負荷を与えて、マグヌス装置にセットする。

セットしたマグヌス管内に一定の時間後、例えば、アセチルコリン等を平滑筋

収縮作用薬として使用した場合、30分後に第1回目の終濃度が 10^{-4} mol/Lとなるように加える。

そして、反応がプラトーに達したところで洗浄し、ベースラインに戻るのを確認した後に、収縮作用薬による刺激を繰り返す。

刺激を与える回数は、所望の安定した疲労状態をもつ毛様体筋を得られるように設定すればよく、1回あたりに与える刺激の質や強さなどによって変化するが、通常、好ましくは3回～50回、さらに好ましくは3～20回、特に好ましくは4～15回である。繰り返し回数を増やすことによってより程度の高い疲労条件が惹起されるが、通常、50回より多く繰り返しても毛様体筋にそれ以上効果的に疲労を与えることができない。また、通常、あまり強くない刺激をある程度の回数繰り返して与えるほうが安定した疲労状態が得られる。

【0016】

第3に、以上により作製した標本について、刺激による収縮率の推移を記録する。

その方法は特に限定されないが、具体的には、次の方法が考えられる。

まず、標本の張力を各回の刺激を加えた後に測定する。次に、その得た測定値をもとに、第1回目の刺激後の収縮張力からベースラインの収縮張力を差し引いた張力を100%として収縮率を算出し、それを記録する。

そして、該毛様体筋の収縮率の低下が安定したとき、好ましくは $50 \pm 30\%$ 、さらに好ましくは $50 \pm 20\%$ 、特に好ましくは $50 \pm 10\%$ に安定的に低下した毛様体筋を標本とする。

化学刺激を電気刺激などに変えてマグヌス装置を用いて本発明の標本を得る場合にも、毛様体筋の収縮率が好ましくは $50 \pm 30\%$ 、さらに好ましくは $50 \pm 20\%$ 、特に好ましくは $50 \pm 10\%$ に安定的に低下した毛様体筋を標本として評価に用いる。

【0017】

第4に、前記により得た標本に対して、評価対象となる試験製剤を用いて反応させる。

具体的な方法としては特に限定されないが、以下の方法を例示できる。

例えば、マグヌス装置を用いる場合、最終回の刺激を与える前に、所定の濃度の試験製剤を含有した人工栄養液でマグヌス管中の液を置換する。

その後、該液で反応させた後に該標本の収縮率の推移を前記と同様に記録する。

【0018】

前記の試験を、試験製剤についての本試験に先立ち、その指標として試験製剤基剤について予備試験として行っても良い。そして、その予備試験の結果と試験製剤についての本試験との結果を比較することによる薬効薬理比較試験を行うことができる。

試験製剤としては、効果が既に判明している既存薬や効果が十分に判明していない新規開発中の薬剤など、特に限定はされず、すべての薬剤の効果、最低薬効量等の評価ができる。この発明の一実施例としては例えば、ビタミンB₁₂(シアノコバラミン)製剤であるサンコバ点眼液0.02% (参天製薬製)、コバラム点眼液0.02% (日本点眼薬研究所製)、ソフティア点眼液0.02% (千寿製薬製)、ファルコバ点眼液0.02% (東洋ファルマー製) およびフラビンアデニンジヌクレオチド製剤であるFAD点眼液0.05% (参天製薬製)、FAD T点眼液0.05% (日東メディック製)、日点FA点眼0.05% (日本点眼薬研究所製)、ピタスト点眼液0.05% および0.1% (千寿製薬製)、フラビタン点眼液0.05% (トーアエイヨー製)などを例示することができる。

【0019】

さらに、前記本試験における試験製剤に換えて、比較対照として標準製剤についての試験を行い、それらの結果を比較することによる薬効比較試験を行うこともできる。

標準薬剤としては、前記の試験に使用した以外の眼精疲労改善用薬剤を用いることができる。

このような薬効薬理比較試験は、同一条件下の被験体であって始めて可能であり、さらに本発明の場合は生体内で生じる本来の疲労状態が再現された毛様体筋を標本として使用することから、客観的かつ相対的な比較が可能となるのである。

【0020】

【実施例】

以下、本発明を実施例に基づき説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

(標本の作製)

供試動物としてウサギ8匹を検疫・馴化して試験に供した。

飼育環境として、室温 $21 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度 $50 \pm 20\%$ 、照明時間12時間(午前7時点灯、午後7時消灯)、換気回数10～15回/時の条件下の室内に設置した動物飼育用ラックを用いて個別に飼育した。

前記供試動物に対してケタラル・セラクタール(4:5)混液1mL/kgの筋肉注射を用いて全身麻酔を行い、眼球を摘出した。

尚、麻酔剤としては、塩酸ケタミン注射液(三共株式会社製、ケタラル50筋注用)及び塩酸キシラジン注射液(バイエル薬品株式会社製、セラクタール2%注犬・猫用)を用いた。

摘出した眼球は強膜切開を行い、眼球の赤道部で半分に切断し、水晶体を除去後強膜から毛様体筋を注意深く剥離した。得られた毛様体筋を幅3mm、長さ6mmに条片に切り標本を得た。

尚、摘出手術にはケラトーム、マイクロナイフ、ピンセット、ハサミなどの眼科用手術器具を使用した。

【0021】

(疲労状態の作製)

前記の過程により得た標本をマグヌス管中に懸垂した。

マグヌス管中には、酸素95%・二酸化炭素5%の混合ガスを通気し、Krebs-Henseleit液を満たした。

Krebs-Henseleit液は、以下に示すA溶液1容、B溶液1容およびC溶液1容を混合し、次に蒸留水6容を加えて十分に混合した後、最後にD溶液1容を加えて調製した。得られた液は遮光し、 37°C に加温して使用した。

以下にAからD溶液の調製方法を示す。A溶液: NaCl 69.2g、KC1 3.50g、 KH_2PO_4 1.63g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.96

gに蒸留水を加えて溶解し全量を1000mLとした。B溶液：グルコース 4.00gに蒸留水を加えて溶解し全量を200mLとした。C溶液：NaHCO₃ 4.20gに蒸留水を加えて溶解し全量を200mLとした。D溶液：CaCl₂・2H₂O 3.68gに蒸留水を加えて溶解し全量を100mLとした。

【0022】

マグヌス管中の標本にまず張力トランスデューサー（等尺性アイソメトリックトランスデューサー、FDピックアップTB-611T型、日本光電工業製）を用いて0.4gの負担を与えて懸垂した。30分後に第1回目の刺激としてアセチルコリン（塩化アセチルコリン、SIGMA製）を終濃度が 10^{-4} mol/Lとなるように加えた。反応がプラトーに達したところで洗浄し、ベースラインに戻るのを確認した後、再度同様の手順で刺激を加えた。この手順を9回繰り返した。

【0023】

各回の刺激による標本の張力を前記張力トランスデューサー、入力箱（JD-112S型、日本光電工業製）、歪み圧力用アンプ（AP-621G型、日本光電工業製）及びAD変換ボード（PCI-20428W、INTELLIGENT INSTRUMENTATION製）を介してデータ収集ソフト（VISUAL DESIGNER ver.2.3、INTELLIGENT INSTRUMENTATION製）に記録した。

その測定値をもとに、第1回目の収縮刺激剤による刺激後の収縮張力からベースラインの収縮張力を差し引いた張力を100%として収縮率を算出し、それを記録した。

その結果を表1～5及び図1に示す。

また、標本がアセチルコリンによる刺激に反応しているか否かを確認する目的で終濃度 10^{-6} mol/Lのアトロピン前処置をした標本についてもその張力を測定した。

その結果を表6～8に示す。

【0024】

【表1】

収縮率 (%) の平均値 ± 標準偏差							
測定回数	86.4 ± 17.3	72.7 ± 19.7	88.4 ± 18.3	71.5 ± 16.6	75.6 ± 22.4	86.2 ± 9.6	
2nd	-	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	
3rd	75.8 ± 19.5	61.3 ± 13.7	77.8 ± 14.8	63.3 ± 24.3	70.9 ± 21.7	74.6 ± 14.3	
	-	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	
4th	68.5 ± 22.4	62.1 ± 20.7	68.2 ± 18.0	53.9 ± 18.8	60.8 ± 16.3	72.6 ± 14.5	
	-	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	
5th	73.0 ± 21.8	49.6 ± 29.7	64.8 ± 15.6	61.1 ± 19.1	53.8 ± 23.2	72.2 ± 11.5	
	-	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	
6th	64.4 ± 16.9	49.0 ± 24.9	62.5 ± 9.0	61.9 ± 24.4	57.5 ± 20.1	65.4 ± 17.7	
	-	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	
7th	57.5 ± 17.4	52.6 ± 28.7	56.7 ± 20.0	50.9 ± 17.0	54.9 ± 17.2	64.9 ± 15.5	
	-	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	
8th	61.9 ± 20.7	25.7 ± 10.3	47.6 ± 15.2	38.7 ± 14.9	49.6 ± 19.6	53.5 ± 11.0	
	-	*	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	
9th	47.5 ± 7.9	32.5 ± 6.0	54.4 ± 16.1	50.8 ± 21.0	48.9 ± 14.1	37.0 ± 17.5	
	-	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	
シ7/コパ7シシ速度	コントロール 0%	0.02%	0.012%	0.0072%	0.0043%	0.0026%	
10th	36.3 ± 16.3	122.7 ± 23.4	128.3 ± 43.8	111.1 ± 23.7	88.6 ± 33.5	36.1 ± 16.0	
	-	**	**	**	*	N.S.	

**P<0.01, *P<0.05, N.S.:no significant(Dunnnett多重比較による)

【0025】

【表2】

群	濃度	測定回数	摘出器官 No. / 収縮張力 (g)					
			1	2	3	4	5	6
シ	コントロール 0%	1st	0.0199	0.0315	0.1726	0.1400	0.1520	0.1824
		2nd	0.0404	0.0476	0.1721	0.1273	0.1316	0.1291
		3rd	0.0428	0.0608	0.1609	0.1053	0.0969	0.1184
		4th	0.0355	0.0569	0.1365	0.1336	0.0916	0.1174
		5th	0.0404	0.0442	0.1316	0.0755	0.0881	0.0984
		6th	0.0106	0.0120	0.0745	0.0701	0.0813	0.0974
		7th	0.0179	0.0193	0.1287	0.0511	0.0803	0.0847
		8th	0.0159	0.0242	0.0901	0.0359	0.0871	0.0754
		9th	0.0316	0.0154	0.0911	0.0320	0.0564	0.0886
		10th	0.0174	0.0139	0.0872	0.0218	0.0478	0.0583
ア	0.02%	1st	0.1648	0.1399	0.0624	0.1135	0.1594	0.2184
		2nd	0.1614	0.1546	0.0638	0.1316	0.1340	0.1706
		3rd	0.1780	0.1433	0.0750	0.1004	0.1227	0.1721
		4th	0.1819	0.1384	0.0677	0.1106	0.0959	0.1555
		5th	0.1189	0.1370	0.0682	0.0789	0.0695	0.1306
		6th	0.1170	0.1370	0.0638	0.0823	0.0407	0.1052
		7th	0.1280	0.1038	0.0482	0.0545	0.0261	0.1013
		8th	0.1052	0.0467	0.0487	0.0462	0.0256	0.0837
		9th	0.0955	0.0477	0.0477	0.0237	0.0192	0.0773
		10th	0.0769	0.0389	0.0389	0.0227	0.0056	0.0358
コ	0.012%	1st	0.0959	0.0950	0.0540	0.0871	0.0730	0.1111
		2nd	0.0872	0.1199	0.0462	0.0905	0.0633	0.1121
		3rd	0.0872	0.1155	0.0564	0.0812	0.0535	0.1009
		4th	0.0891	0.0989	0.0642	0.0690	0.0506	0.1184
		5th	0.0530	0.0867	0.0286	0.0558	0.0271	0.0847
		6th	0.0398	0.0857	0.0266	0.0588	0.0257	0.0774
		7th	0.0354	0.0730	0.0149	0.0378	0.0393	0.0730
		8th	0.0417	0.0666	0.0208	0.0422	0.0232	0.0711
		9th	0.0315	0.0579	0.0159	0.0226	0.0183	0.0506
		10th	0.0540	0.0125	0.0140	0.0231	0.0164	0.0262
バ	0.0072%	1st	0.0725	0.0823	0.1086	0.0594	0.1394	0.1540
		2nd	0.0921	0.0779	0.1282	0.0980	0.0925	0.1458
		3rd	0.0413	0.0862	0.1282	0.0955	0.0823	0.1418
		4th	0.0769	0.0843	0.1145	0.0975	0.0799	0.1228
		5th	0.0286	0.0686	0.0891	0.0843	0.0706	0.1160
		6th	0.0467	0.0618	0.0823	0.0589	0.0691	0.1018
		7th	0.0384	0.0628	0.0720	0.0526	0.0667	0.0774
		8th	0.0418	0.0462	0.0735	0.0262	0.0642	0.0764
		9th	0.0159	0.0481	0.0144	0.0321	0.0481	0.0676
		10th	0.0657	0.0301	0.0115	0.0301	0.0520	0.0535
ミ	0.0043%	1st	0.0804	0.1140	0.0667	0.1243	0.1043	0.0935
		2nd	0.0696	0.1150	0.0540	0.1414	0.0848	0.0935
		3rd	0.0301	0.1101	0.0321	0.0940	0.1053	0.0718
		4th	0.0403	0.1028	0.0384	0.0613	0.0984	0.0535
		5th	0.0369	0.0935	0.0282	0.0583	0.0789	0.0530
		6th	0.0340	0.0832	0.0260	0.0691	0.0584	0.0457
		7th	0.0350	0.0901	0.0267	0.0374	0.0467	0.0350
		8th	0.0393	0.0847	0.0174	0.0256	0.0467	0.0374
		9th	0.0472	0.0716	0.0101	0.0256	0.0350	0.0232
		10th	0.0140	0.0921	0.0067	0.0100	0.0462	0.0310
ン	0.0026%	1st	0.1175	0.0814	0.1189	0.1091	0.0760	0.0853
		2nd	0.1165	0.1004	0.0989	0.1101	0.0867	0.0916
		3rd	0.1072	0.1112	0.0657	0.1038	0.0687	0.0760
		4th	0.1106	0.0814	0.0642	0.0637	0.0667	0.0760
		5th	0.1072	0.0838	0.0500	0.0657	0.0540	0.0794
		6th	0.0955	0.0487	0.0461	0.0681	0.0575	0.0701
		7th	0.0882	0.0604	0.0398	0.0584	0.0653	0.0540
		8th	0.0799	0.0404	0.0315	0.0452	0.0623	0.0438
		9th	0.0813	0.0282	0.0232	0.0281	0.0506	0.0355
		10th	0.0682	0.0248	0.0247	0.0252	0.0350	0.0286
アトロピン	10 ⁻⁶ mol/L	1st	0.0228	0.0262				

【0026】

【表3】

群	濃度	測定回数	摘出器官 No. / 収縮強力 (g)					
			1	2	3	4	5	6
シ	コントロール 0%	1st	0.1214	0.0989	0.2649	0.2479	0.2131	0.2136
		2nd	0.1048	0.1013	0.2439	0.2186	0.1995	0.1609
		3rd	0.1121	0.0984	0.2205	0.1761	0.1609	0.1482
		4th	0.0936	0.0906	0.2166	0.1766	0.1492	0.1433
		5th	0.1043	0.0759	0.1960	0.1458	0.1384	0.1330
		6th	0.0667	0.0515	0.1233	0.1219	0.1326	0.1247
		7th	0.0726	0.0711	0.1526	0.1219	0.1199	0.1028
		8th	0.0692	0.0598	0.1511	0.0760	0.1272	0.0954
		9th	0.0726	0.0510	0.1316	0.0770	0.0842	0.0876
		10th	0.0658	0.0476	0.1091	0.0413	0.0618	0.0754
ア	0.02%	1st	0.2434	0.1936	0.1136	0.2083	0.1955	0.3015
		2nd	0.2283	0.1800	0.1039	0.2014	0.1530	0.2531
		3rd	0.2263	0.1721	0.1009	0.1555	0.1428	0.2453
		4th	0.2229	0.1887	0.0995	0.1408	0.1286	0.2214
		5th	0.1458	0.1594	0.0995	0.1341	0.0720	0.2097
		6th	0.1521	0.1585	0.0941	0.1140	0.0490	0.1828
		7th	0.1428	0.1341	0.0672	0.0852	0.0602	0.1647
		8th	0.1155	0.0594	0.0594	0.0789	0.0319	0.1174
		9th	0.1272	0.0619	0.0619	0.0501	0.0319	0.1088
		10th	0.1526	0.1068	0.1068	0.1180	0.0500	0.1682
ノ	0.012%	1st	0.1443	0.2078	0.1067	0.2101	0.1370	0.1809
		2nd	0.1404	0.2180	0.0857	0.2131	0.1018	0.1809
		3rd	0.1331	0.2131	0.0872	0.1857	0.0925	0.1575
		4th	0.1267	0.1941	0.0901	0.1730	0.0891	0.1556
		5th	0.0837	0.1687	0.0525	0.1564	0.0574	0.1194
		6th	0.0881	0.1594	0.0579	0.1472	0.0559	0.1267
		7th	0.0710	0.1360	0.0467	0.1193	0.0506	0.1194
		8th	0.0710	0.1160	0.0457	0.0768	0.0466	0.1194
		9th	0.0574	0.1125	0.0467	0.1252	0.0413	0.0833
		10th	0.1189	0.2390	0.0721	0.1965	0.0598	0.1072
コ	0.012%	1st	0.1722	0.1546	0.1794	0.2386	0.1712	0.2368
		2nd	0.1673	0.1433	0.1575	0.2196	0.1179	0.2068
		3rd	0.1282	0.1380	0.1409	0.2000	0.1072	0.1965
		4th	0.1346	0.1311	0.1272	0.1947	0.0979	0.1824
		5th	0.0955	0.1204	0.1082	0.1785	0.0965	0.1711
		6th	0.1092	0.1233	0.0974	0.1444	0.0960	0.1594
		7th	0.0794	0.0979	0.0925	0.1346	0.0872	0.1404
		8th	0.0647	0.0686	0.0901	0.1273	0.0813	0.1130
		9th	0.0569	0.0921	0.0364	0.1224	0.0759	0.0955
		10th	0.1629	0.1346	0.0691	0.2000	0.0906	0.1584
バ	0.0072%	1st	0.1116	0.1853	0.1629	0.2034	0.1629	0.1839
		2nd	0.0955	0.1619	0.1248	0.1711	0.1409	0.1819
		3rd	0.0584	0.1594	0.1165	0.1262	0.1341	0.1512
		4th	0.0638	0.1482	0.0994	0.0925	0.1238	0.1253
		5th	0.0657	0.1326	0.0809	0.0857	0.0940	0.1077
		6th	0.0603	0.1301	0.0838	0.0930	0.0804	0.1062
		7th	0.0603	0.1272	0.0819	0.0603	0.0745	0.0916
		8th	0.0652	0.1121	0.0726	0.0476	0.0691	0.0852
		9th	0.0691	0.1121	0.0448	0.0549	0.0569	0.0735
		10th	0.0520	0.1150	0.1195	0.0906	0.0975	0.0950
ラ	0.0043%	1st	0.1814	0.1512	0.2185	0.1594	0.1805	0.2034
		2nd	0.1736	0.1664	0.1912	0.1443	0.1781	0.1922
		3rd	0.1590	0.1610	0.1658	0.1350	0.1366	0.1561
		4th	0.1487	0.1253	0.1643	0.0984	0.1424	0.1600
		5th	0.1477	0.1288	0.1428	0.1048	0.1234	0.1600
		6th	0.1331	0.0941	0.1448	0.0994	0.1214	0.1248
		7th	0.1316	0.1039	0.1291	0.0930	0.1097	0.1224
		8th	0.1165	0.0716	0.1018	0.0652	0.1146	0.1126
		9th	0.1170	0.0692	0.0608	0.0364	0.0726	0.0731
		10th	0.1023	0.0609	0.0608	0.0388	0.0687	0.0442
ミ	0.0026%	1st	0.1214	0.0989	0.2649	0.2479	0.2131	0.2136
		2nd	0.1048	0.1013	0.2439	0.2186	0.1995	0.1609
		3rd	0.1121	0.0984	0.2205	0.1761	0.1609	0.1482
		4th	0.0936	0.0906	0.2166	0.1766	0.1492	0.1433
		5th	0.1043	0.0759	0.1960	0.1458	0.1384	0.1330
		6th	0.0667	0.0515	0.1233	0.1219	0.1326	0.1247
		7th	0.0726	0.0711	0.1526	0.1219	0.1199	0.1028
		8th	0.0692	0.0598	0.1511	0.0760	0.1272	0.0954
		9th	0.0726	0.0510	0.1316	0.0770	0.0842	0.0876
		10th	0.0658	0.0476	0.1091	0.0413	0.0618	0.0754
ン	0.0026%	1st	0.2434	0.1936	0.1136	0.2083	0.1955	0.3015
		2nd	0.2283	0.1800	0.1039	0.2014	0.1530	0.2531
		3rd	0.2263	0.1721	0.1009	0.1555	0.1428	0.2453
		4th	0.2229	0.1887	0.0995	0.1408	0.1286	0.2214
		5th	0.1458	0.1594	0.0995	0.1341	0.0720	0.2097
		6th	0.1521	0.1585	0.0941	0.1140	0.0490	0.1828
		7th	0.1428	0.1341	0.0672	0.0852	0.0602	0.1647
		8th	0.1155	0.0594	0.0594	0.0789	0.0319	0.1174
		9th	0.1272	0.0619	0.0619	0.0501	0.0319	0.1088
		10th	0.1526	0.1068	0.1068	0.1180	0.0500	0.1682
アトロピン	10 ⁻⁴ mol/L	1st	0.1443	0.2078	0.1067	0.2101	0.1370	0.1809
		2nd	0.1404	0.2180	0.0857	0.2131	0.1018	0.1809
		3rd	0.1331	0.2131	0.0872	0.1857	0.0925	0.1575
		4th	0.1267	0.1941	0.0901	0.1730	0.0891	0.1556
		5th	0.0837	0.1687	0.0525	0.1564	0.0574	0.1194
		6th	0.0881	0.1594	0.0579	0.1472	0.0559	0.1267
		7th	0.0710	0.1360	0.0467	0.1193	0.0506	0.1194
		8th	0.0710	0.1160	0.0457	0.0768	0.0466	0.1194
		9th	0.0574	0.1125	0.0467	0.1252	0.0413	0.0833
		10th	0.1189	0.2390	0.0721	0.1965	0.0598	0.1072

【表4】

群	濃度	測定回数	調出器官 No.			収縮張力 (g)		
			1	2	3	4	5	6
シ	コントロール 0%	1st	0.1015	0.0674	0.0923	0.1079	0.0611	0.0312
		2nd	0.0644	0.0537	0.0718	0.0913	0.0679	0.0318
		3rd	0.0693	0.0376	0.0598	0.0708	0.0640	0.0298
		4th	0.0581	0.0337	0.0801	0.0430	0.0578	0.0259
		5th	0.0639	0.0317	0.0644	0.0703	0.0503	0.0346
		6th	0.0561	0.0385	0.0488	0.0518	0.0513	0.0273
		7th	0.0547	0.0518	0.0239	0.0708	0.0396	0.0181
		8th	0.0533	0.0356	0.0610	0.0401	0.0601	0.0200
		9th	0.0410	0.0356	0.0405	0.0450	0.0278	0.0190
		10th	0.0484	0.0337	0.0219	0.0195	0.0142	0.0171
ア	0.02%	1st	0.0786	0.0537	0.0512	0.0948	0.0361	0.0831
		2nd	0.0669	0.0254	0.0401	0.0698	0.0190	0.0825
		3rd	0.0483	0.0288	0.0259	0.0551	0.0201	0.0732
		4th	0.0410	0.0303	0.0318	0.0303	0.0327	0.0859
		5th	0.0289	0.0224	0.0313	0.0552	0.0025	0.0791
		6th	0.0351	0.0215	0.0303	0.0317	0.0083	0.0776
		7th	0.0148	0.0303	0.0190	0.0307	0.0341	0.0634
		8th	0.0103	0.0127	0.0127	0.0327	0.0063	0.0337
		9th	0.0317	0.0142	0.0142	0.0264	0.0127	0.0313
		10th	0.0757	0.0679	0.0679	0.0933	0.0444	0.1324
コ	0.012%	1st	0.0484	0.1128	0.0527	0.1230	0.0840	0.0698
		2nd	0.0532	0.0981	0.0395	0.1226	0.0385	0.0688
		3rd	0.0459	0.0976	0.0308	0.1045	0.0390	0.0568
		4th	0.0376	0.0952	0.0259	0.1040	0.0385	0.0372
		5th	0.0307	0.0820	0.0239	0.1006	0.0303	0.0547
		6th	0.0293	0.0737	0.0313	0.0884	0.0302	0.0493
		7th	0.0356	0.0630	0.0318	0.0815	0.0113	0.0464
		8th	0.0293	0.0494	0.0249	0.0346	0.0234	0.0483
		9th	0.0259	0.0546	0.0308	0.1026	0.0230	0.0327
		10th	0.0649	0.2265	0.0581	0.1734	0.0434	0.0810
バ	0.0072%	1st	0.0997	0.0723	0.0708	0.1792	0.0318	0.0826
		2nd	0.0752	0.0654	0.0293	0.1216	0.0254	0.0610
		3rd	0.0869	0.0518	0.0127	0.1045	0.0249	0.0547
		4th	0.0577	0.0468	0.0127	0.0972	0.0180	0.0598
		5th	0.0869	0.0518	0.0191	0.0942	0.0259	0.0551
		6th	0.0625	0.0615	0.0151	0.0855	0.0269	0.0578
		7th	0.0410	0.0351	0.0205	0.0820	0.0205	0.0630
		8th	0.0229	0.0224	0.0166	0.1011	0.0171	0.0366
		9th	0.0410	0.0440	0.0220	0.0903	0.0278	0.0279
		10th	0.0972	0.1045	0.0576	0.1699	0.0366	0.1049
ラ	0.0043%	1st	0.0312	0.0713	0.0962	0.0791	0.0588	0.0904
		2nd	0.0259	0.0489	0.0708	0.0297	0.0561	0.0884
		3rd	0.0283	0.0493	0.0844	0.0322	0.0288	0.0796
		4th	0.0235	0.0454	0.0810	0.0312	0.0254	0.0718
		5th	0.0288	0.0391	0.0527	0.0274	0.0151	0.0547
		6th	0.0263	0.0469	0.0578	0.0239	0.0220	0.0605
		7th	0.0253	0.0371	0.0552	0.0229	0.0278	0.0566
		8th	0.0259	0.0274	0.0552	0.0220	0.0224	0.0478
		9th	0.0219	0.0405	0.0347	0.0293	0.0219	0.0503
		10th	0.0380	0.0229	0.1128	0.0806	0.0513	0.0640
ミ	0.0028%	1st	0.0639	0.0698	0.0998	0.0503	0.1045	0.1181
		2nd	0.0571	0.0660	0.0923	0.0342	0.0914	0.1006
		3rd	0.0518	0.0498	0.1001	0.0312	0.0679	0.0801
		4th	0.0381	0.0439	0.1001	0.0347	0.0757	0.0840
		5th	0.0405	0.0450	0.0928	0.0391	0.0694	0.0808
		6th	0.0376	0.0454	0.0987	0.0313	0.0639	0.0547
		7th	0.0434	0.0435	0.0893	0.0346	0.0444	0.0684
		8th	0.0366	0.0312	0.0703	0.0200	0.0523	0.0688
		9th	0.0357	0.0410	0.0376	0.0083	0.0220	0.0376
		10th	0.0361	0.0361	0.0361	0.0136	0.0337	0.0156
アトロピン	10 ⁻³ mol/L	1st	0.0102	0.0210				

【0028】

【表5】

群	濃度	測定回数	摘出器官 No. / 収縮率 (%)					
			1	2	3	4	5	6
シ	コントロール 0%	1st	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
		2nd	63.4	79.7	77.8	84.6	111.1	101.9
		3rd	68.3	55.8	64.6	65.6	104.7	95.5
		4th	57.2	50.0	86.8	39.9	94.3	83.0
		5th	63.0	47.0	69.8	65.2	82.3	110.9
		6th	55.3	58.6	52.9	48.0	84.0	87.5
		7th	53.9	78.9	25.9	65.6	64.8	58.0
		8th	52.5	52.8	66.1	37.2	98.4	64.1
		9th	40.4	52.8	43.9	41.7	45.5	60.9
		10th	47.7	50.0	23.7	18.1	23.2	54.8
ア	0.02%	1st	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
		2nd	85.1	47.3	78.3	73.6	52.6	99.3
		3rd	61.5	53.6	50.6	58.1	55.7	88.1
		4th	52.2	56.4	62.1	32.0	90.6	79.3
		5th	34.2	41.7	61.1	58.2	6.9	95.2
		6th	44.7	40.0	59.2	33.4	23.0	93.4
		7th	18.8	56.4	37.1	32.4	94.5	76.3
		8th	13.1	23.6	24.8	34.5	17.5	40.6
		9th	40.3	26.4	27.7	27.8	35.2	37.7
		10th	96.3	126.4	132.6	98.4	123.0	159.3
コ	0.012%	1st	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
		2nd	109.9	87.0	75.0	99.7	60.2	98.6
		3rd	94.8	86.5	58.4	85.0	60.9	81.1
		4th	77.7	84.4	49.1	84.6	60.2	53.3
		5th	63.4	72.7	45.4	81.8	47.3	78.4
		6th	60.5	65.3	59.4	71.9	47.2	70.6
		7th	73.6	55.9	60.3	66.3	17.7	66.5
		8th	60.5	43.8	47.2	28.1	36.6	69.2
		9th	53.5	48.4	58.4	83.4	35.9	46.8
		10th	134.1	200.8	110.2	141.0	87.8	116.0
バ	0.0072%	1st	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
		2nd	75.4	90.5	41.4	67.9	79.9	73.8
		3rd	87.2	71.6	17.9	58.3	78.3	66.2
		4th	57.9	64.7	17.9	54.2	56.6	72.2
		5th	67.1	71.6	27.0	52.6	81.4	66.7
		6th	62.7	85.1	21.3	47.7	84.6	69.7
		7th	41.1	48.5	29.0	45.8	64.5	76.3
		8th	23.0	31.0	23.4	56.4	53.8	44.3
		9th	41.1	60.9	31.1	50.4	87.4	33.8
		10th	97.5	144.5	81.4	94.8	121.4	127.0
ミ	0.0043%	1st	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
		2nd	83.0	65.8	73.6	37.5	95.7	97.8
		3rd	90.7	69.1	87.7	40.7	49.1	88.1
		4th	75.3	63.7	63.4	39.4	43.3	79.4
		5th	92.3	54.8	54.8	34.6	25.8	60.5
		6th	84.3	65.8	60.1	30.2	37.5	66.9
		7th	81.1	52.0	57.4	29.0	47.4	62.6
		8th	83.0	38.4	57.4	27.8	38.2	52.9
		9th	70.2	56.8	36.1	37.0	37.4	55.6
		10th	121.8	32.1	117.3	101.9	87.5	70.8
ン	0.0026%	1st	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
		2nd	89.4	94.6	92.7	68.0	87.5	85.2
		3rd	81.1	71.3	100.5	62.0	85.0	67.8
		4th	59.6	62.9	100.5	69.0	72.4	71.1
		5th	63.4	64.5	93.2	77.7	86.4	68.2
		6th	58.8	65.0	99.1	62.2	61.1	46.3
		7th	67.9	62.3	89.7	68.8	42.5	57.9
		8th	57.3	44.7	70.6	39.8	50.0	58.3
		9th	55.9	58.7	37.8	16.5	21.1	31.8
		10th	56.5	51.7	36.2	27.0	32.2	13.2
アトロピン	10 ⁻⁶ mg/L	1st	-	-	-	-	-	-

【0029】

【表 6】

濃 度	摘出器官No. / 収縮張力(g)		平均値±標準偏差	抑 制 率 (%)
	1	2		
コントロール	0.1487	0.1693	0.1590 ± 0.0146	-
10 ⁻⁸ mol/L	0.0228	0.0262	0.0245 ± 0.0024	84.6

【表 7】

濃 度	摘出器官No. / 収縮張力(g)		平均値±標準偏差	抑 制 率 (%)
	1	2		
コントロール	0.1829	0.2630	0.2230 ± 0.0566	-
10 ⁻⁸ mol/L	0.0330	0.0472	0.0401 ± 0.0100	82.0

【表 8】

濃 度	摘出器官No. / 収縮張力(g)		平均値±標準偏差	抑 制 率 (%)
	1	2		
コントロール	0.0342	0.0937	0.0640 ± 0.0421	-
10 ⁻⁸ mol/L	0.0102	0.0210	0.0156 ± 0.0076	75.6

【0030】

表1～5および図1が示すが如く、アセチルコリンによる刺激を繰り返すことにより収縮率の減少すなわち収縮張力が減少したことから毛様体筋の疲労状態を作製できたことがわかる。また表6～8より、アセチルコリンは、毛様体筋において収縮反応を惹起したが、アトロピン前処置により抑制されたことからアセチルコリンによる収縮反応がムスカリン受容体を介した反応であることが確認でき、生理的条件下に極めて近い収縮刺激剤であることがわかる。

【0031】

(予備試験)

前記の刺激を加えた後、第10回目の刺激を加える前に0%、0.02%、0.012%、0.0072%、0.0043%及び0.0026%の各濃度のシ

シアノコバラミン含有Krebs-Henseleit液でマグヌス管中の液を置換し、標本の張力を前記と同様に記録した。

この予備試験でシアノコバラミンを用いたのは、シアノコバラミンが以下の本試験で用いる試験製剤の有効成分であるからである。

その結果を表1～5、図1及び図2に示す。

なお、シアノコバラミン含有Krebs-Henseleit液は以下のように調製した。すなわち、前記のA溶液1容、B溶液1容およびC溶液1容を混合し、次に蒸留水5容及びシアノコバラミン10倍濃縮液1容を加えて十分に混合した後、最後にD溶液1容を加えて調製した。調製した液は遮光し、37℃に加温して使用した。

表1～5、図1および図2が示すが如く、シアノコバラミン0.0026%では何ら影響を及ぼさなかったが、0.0043%から濃度依存的にアセチルコリンによる収縮反応の減弱を抑制しているのがわかる。また表2が示すように0.0043%以上のシアノコバラミンはいずれの濃度においてもベースラインの張力に影響を及ぼさなかったことから、0.0043%以上のシアノコバラミンはそれ自身では直接的な作用を示さず、抗疲労効果を有することがわかった。そして、シアノコバラミンによる抗疲労効果は0.012%でほぼプラトーになることがわかる。

以上より、本試験に対する指標薬剤シアノコバラミンの濃度を0.012%と設定し、以下の本試験における指標として用いた。

【0032】

(本試験)

予備試験と同様の試験を予備試験におけるシアノコバラミンにかえて、試験製剤としてシアノコバラミン0.02%点眼剤であるTP263（東洋ファルマー株式会社製）及び標準製剤としてサンコバ点眼液（参天製薬株式会社製）を用いて行った。その結果をTukey多重比較法で評価した。

その結果を表9、図3及び図4に示す。

【0033】

【表9】

製剤の有無	刺激回数	平均値±標準偏差	Tukey多重比較
無	2nd	77.3±19.2 78.3±17.6 75.7±12.3 83.1±18.6	<div> <div>N.S.</div> <div>N.S.</div> <div>N.S.</div> <div>N.S.</div> </div>
無	3rd	61.2±17.3 55.1±12.1 68.0±9.0 70.8±14.9	<div> <div>N.S.</div> <div>N.S.</div> <div>N.S.</div> <div>N.S.</div> </div>
無	4th	51.6±15.1 56.6±17.7 58.8±12.2 64.8±21.0	<div> <div>N.S.</div> <div>N.S.</div> <div>N.S.</div> <div>N.S.</div> </div>
無	5th	54.7±18.0 50.4±13.8 50.5±14.1 54.3±14.9	<div> <div>N.S.</div> <div>N.S.</div> <div>N.S.</div> <div>N.S.</div> </div>
無	6th	48.1±14.1 55.4±16.6 50.9±8.8 52.0±18.2	<div> <div>N.S.</div> <div>N.S.</div> <div>N.S.</div> <div>N.S.</div> </div>
無	7th	44.0±10.7 39.6±15.8 50.3±12.8 56.2±15.2	<div> <div>N.S.</div> <div>N.S.</div> <div>N.S.</div> <div>N.S.</div> </div>
無	8th	44.7±16.7 43.8±13.6 47.6±12.3 49.0±16.3	<div> <div>N.S.</div> <div>N.S.</div> <div>N.S.</div> <div>N.S.</div> </div>
無	9th	43.0±14.0 41.7±14.4 43.8±14.0 46.9±14.5	<div> <div>N.S.</div> <div>N.S.</div> <div>N.S.</div> <div>N.S.</div> </div>
製剤無添加 試験製剤基剤 試験製剤 標準製剤	10th	40.7±11.7 48.4±19.3 91.9±18.2 84.2±35.4	<div> <div>N.S.</div> <div>**</div> <div>**</div> <div>**</div> </div>

**:P<0.01, *:P<0.05, N.S.:no significant

【0034】

表9、図3及び図4によれば、試験製剤は毛様体筋における抗疲労効果を有することがわかった。また試験製剤基剤よりも効果が高いこともわかった。

さらに、試験製剤と標準製剤の比較においては、いずれも毛様体筋における抗

疲労効果を有し、その効果は同等であるということがわかった。

【0035】

【発明の効果】

本発明のモデルは、本明細書の「課題を解決するための手段」の項に記載したように眼精疲労改善薬の評価に利用可能なモデルとして有用である。さらに、本発明のモデルの作製方法および本発明の標本を用いた薬物の評価方法も提供する。優れた評価系の提供は優れた薬剤の開発に不可欠であり、優れた薬剤の提供につながる重要な発明である。

本発明の *in vitro* モデルは、① *in vitro* 試験でありながら生理条件下に近い条件で評価が行える、②作製時の条件を変化させることによって所望の疲労状態をもつ標本を再現性よく、安定的かつ簡便に得られる、③被験物質の作用強度を定量的に把握することが可能である、④従来の方法に比べて実際の眼精疲労に近いモデルである一などの優れた特徴をもつ。

【0036】

従来の *in vitro* モデル（例えば、特開平 7-133225 に記載のモデル）は、毛様体筋の一過性の収縮に対してアンタゴニスト作用を示す薬剤の評価やスクリーニングを行う系としては適当であるが、眼精疲労は一過性の毛様体筋の収縮に起因するものではないため、眼精疲労改善剤の評価系としてあまり適当だとはいえない。また、毛様体筋に収縮を惹起する前に被験薬剤を添加して評価を行う系（予防投与系）であるため、筋収縮を予防する薬剤（予防薬）の評価系としては適当であるが、治療薬の評価系として適当だとはいえない。

それに対して、本発明のモデルは、毛様体筋に複数回、収縮弛緩を惹起させることによって得た安定した疲労状態にある毛様体筋を使用する評価系であり、従来のモデルに比べて実際の眼精疲労状態により近い状態の毛様体筋を用いたモデルである。また、疲労状態作製後に薬剤を添加する系（治療投与系）であるため、治療薬の評価系として適当である。

さらに、本発明の標本を用いた評価方法は、①薬物の効果を再現性よく評価することができる、②薬物の効果を定量的に把握することができる、③標準薬と被験薬物の作用強度を比較することが容易である、④既存薬のみならず、新規の薬

物のスクリーニング系としても有用である一などの優れた特徴をあわせもつ。

【図面の簡単な説明】

【図1】

標本作製及び予備試験におけるアセチルコリン刺激による収縮率の推移を示したグラフである。

【図2】

予備試験における第10回目のアセチルコリン刺激による収縮率の比較を示したグラフである。

【図3】

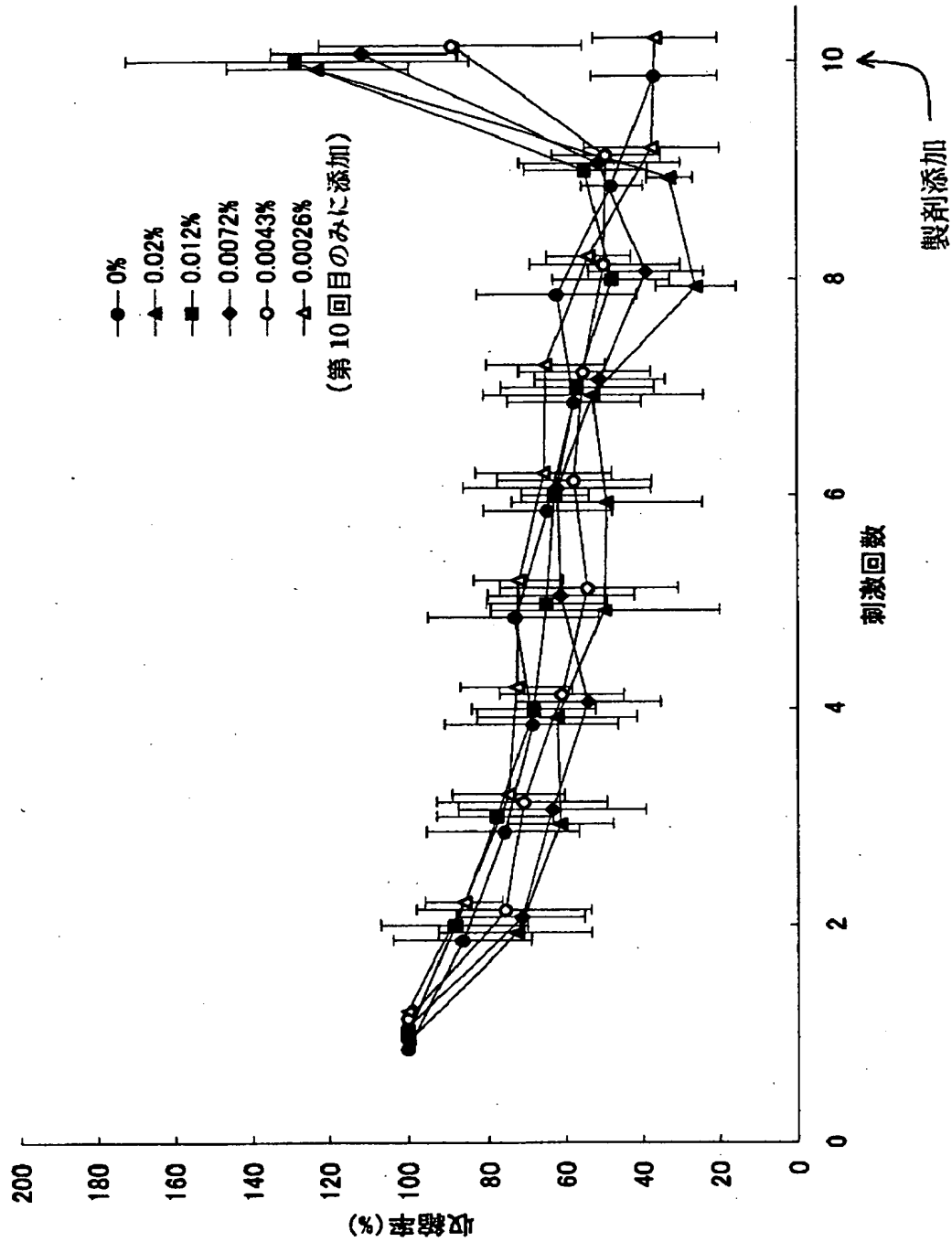
本試験におけるアセチルコリン刺激による収縮率の推移を示したグラフである。

【図4】

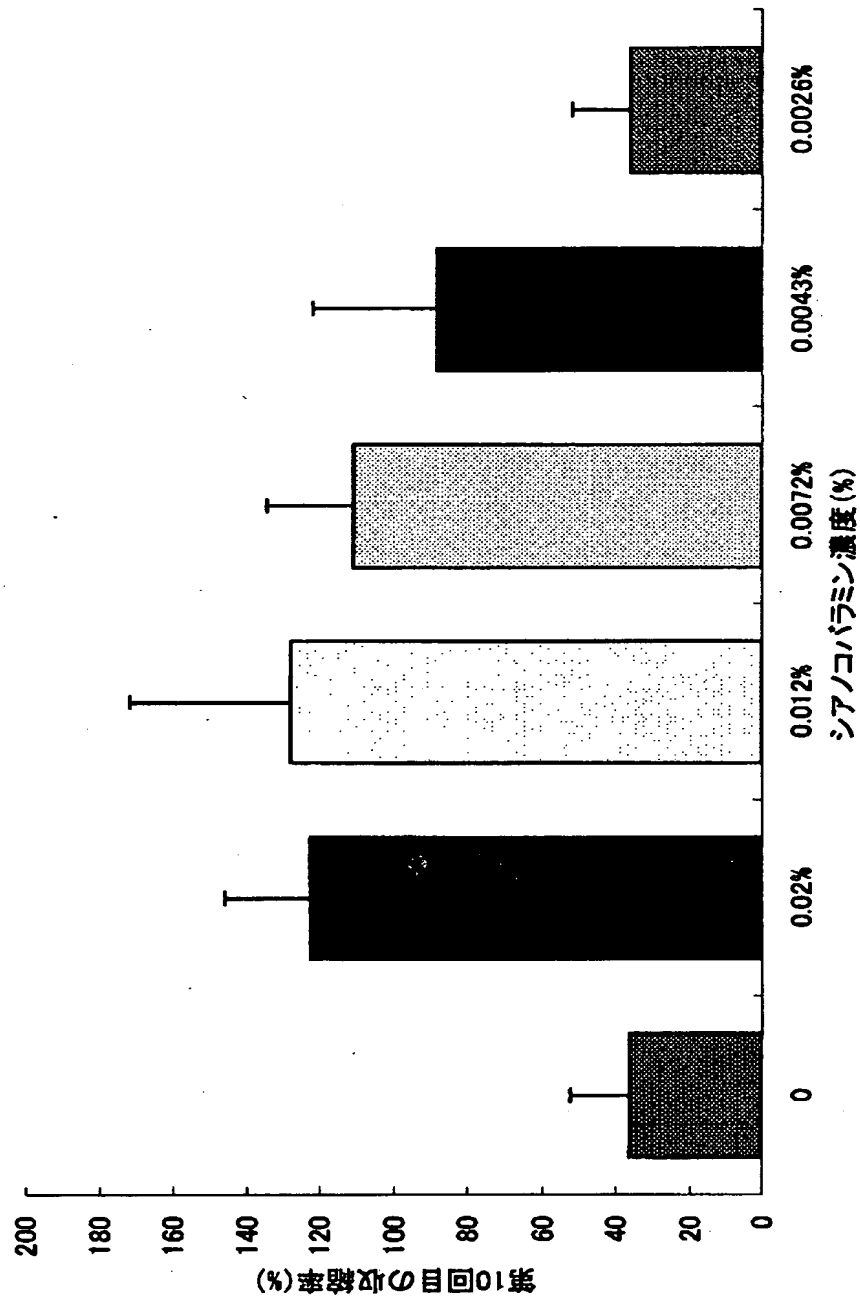
本試験における第10回目のアセチルコリン刺激による収縮率の比較を示したグラフである。

【書類名】 図面

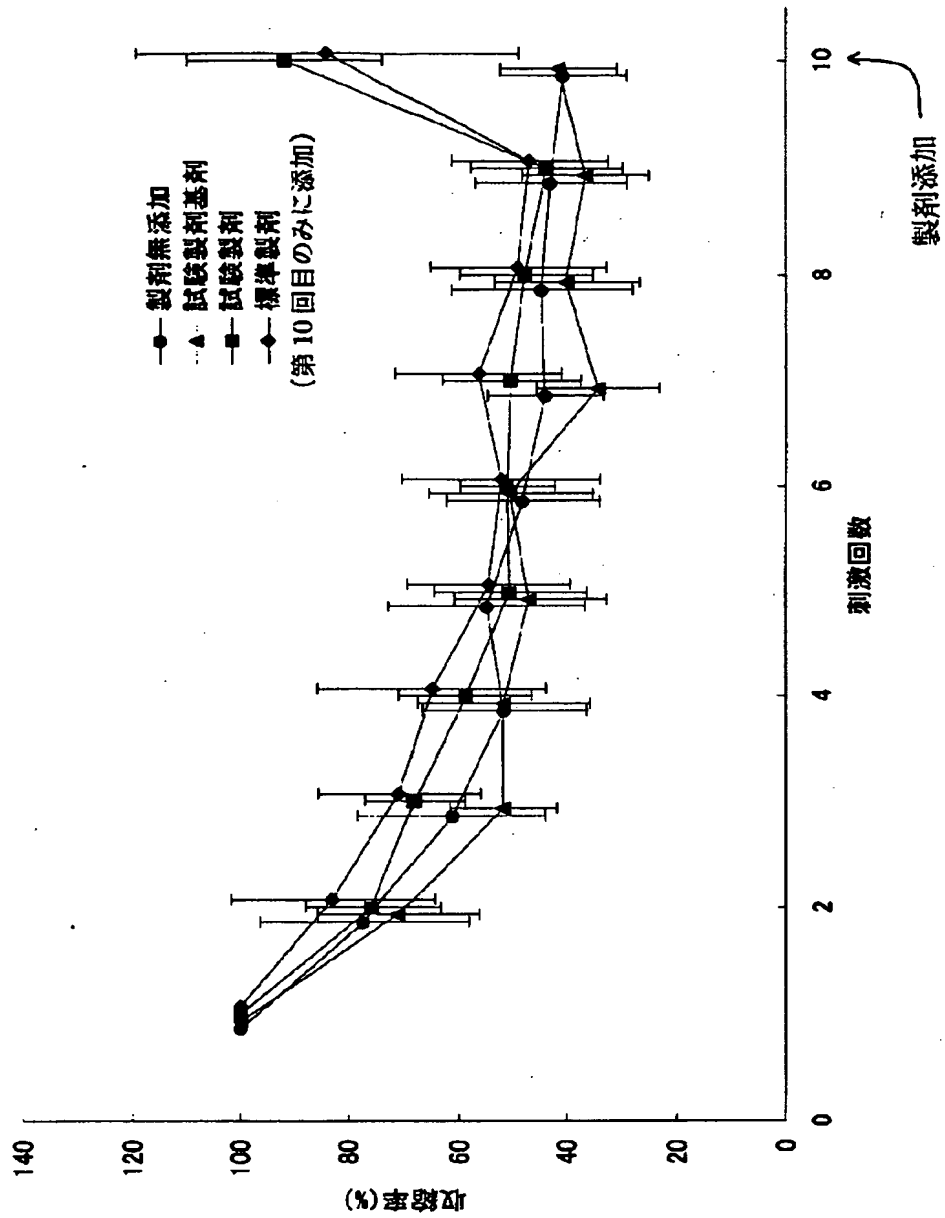
【図1】



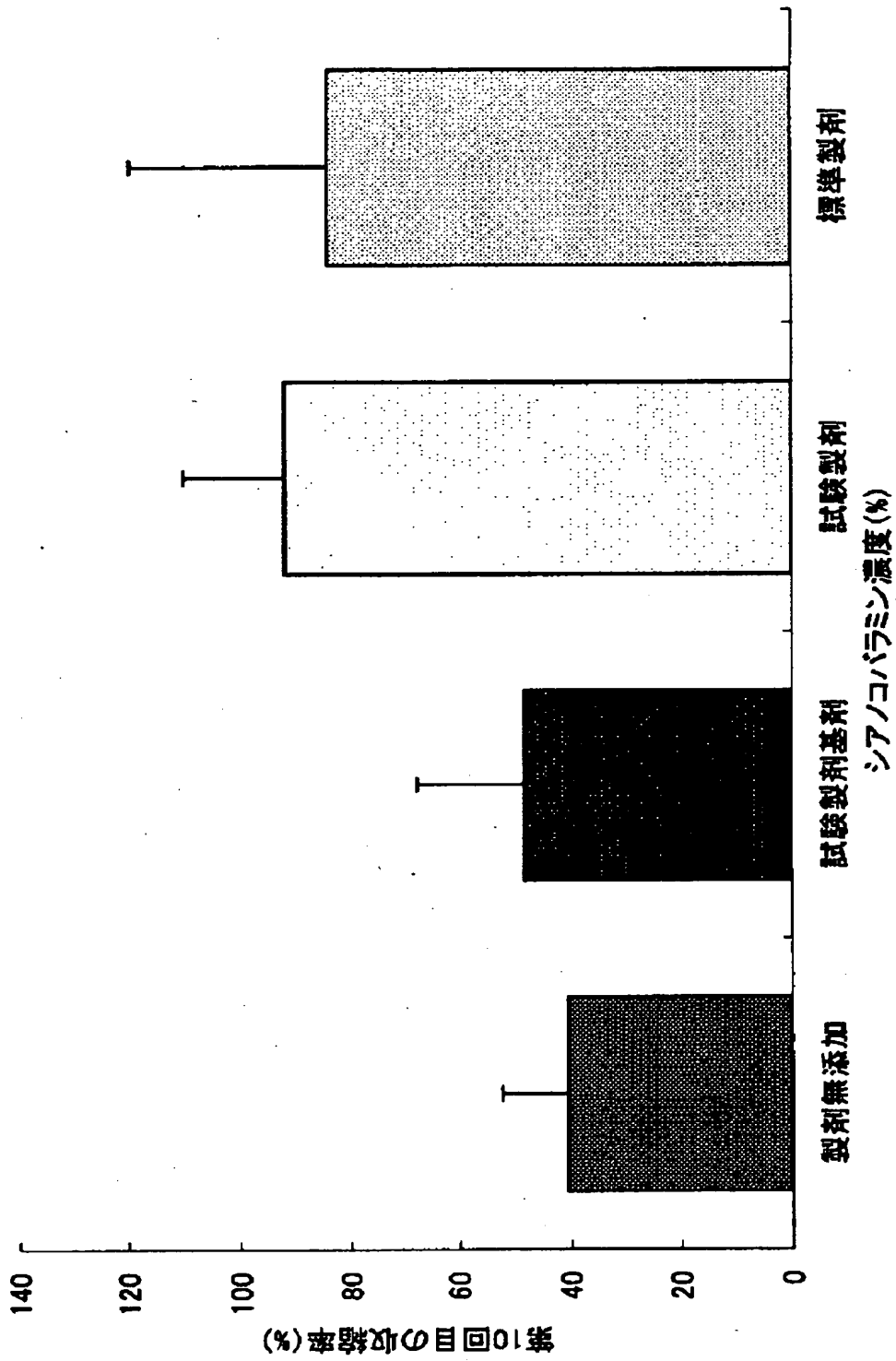
【図2】



【図 3】



【図4】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 優れた眼精疲労モデル、その優れた作製方法、そのモデルを用いた優れた薬物評価方法およびその評価法を用いて選択された優れた薬物を提供する。

【解決手段】 複数回の刺激による収縮反応によって毛様体筋の筋収縮力を安定的に低下させてなる眼精疲労モデル、その作製方法、その標本を用いた薬物評価方法およびその評価法を用いて選択された薬物。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [301009597]

1. 変更年月日	2001年 2月 9日
[変更理由]	新規登録
住 所	大阪府富田林市若松町東1丁目9番32号
氏 名	株式会社生物技術研究所